Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel
Vorsteher: Prof. R. Doerr

Das Verhalten der übertragbaren Lysine („Bakteriophagen") in der Zirkulation von Kalt- und Warmblütern

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen medizinischen Fakultät der Universität Basel

vorgelegt von

Andreas Werthemann
von Basel

Druck von R. Oldenbourg in München
1922

Von der medizinischen Fakultät Basel genehmigt
auf Antrag von Prof. R. Doerr

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Diese Arbeit erscheint im „Archiv für Hygiene", Bd. 91, Jahrg. 1922
6. Heft

Über das Verhalten der sogenannten „Bakteriophagen“ (übertragbaren Lysine) im Organismus der Warmblüter liegen bereits mehrfache Angaben vor. Die Untersuchungen, auf welche sie sich stützen, wurden zum Teile ausgeführt, um Fragestellungen von vorwiegend theoretischem Interesse einer Entscheidung zuzuführen, entsprangen aber in ihrer Mehrzahl dem Bestreben, die unerläßlichen Grundlagen für die therapeutische Anwendung der neuentdeckten bakteriziden Stoffe bei infektionskranken Menschen zu schaffen. Eine kurze Übersicht, die indes auf absolute Vollständigkeit keinen Anspruch erhebt, mag über die wichtigsten bisher bekannt gewordenen Daten Aufschluß geben.

D'Hérelle stellte fest, daß per os verabreichte Bakteriophagen alsbald im Darminhalt bzw. in den Stuhlentleerungen erscheinen, und zwar bei Tieren sowohl als auch bei Menschen. Da die fraglichen Stoffe hiebei den Magen passieren müssen, war anzunehmen, daß sie weder durch die H-Jonenkonzentration des Magensaftes noch durch die Fermente der verschiedenen Darmabschnitte leiden, eine Annahme, die in der Folge durch Depoorter und Maisin verifiziert werden konnte. Dementsprechend fand auch Appelmans in den Exkrementen von Meerschweinchen und Mäusen, an welche er mit lytischen Filtraten getränktes Brot verfüttert hatte, die lytischen Substanzen wieder; sie hielten sich im Darme einige Tage, um dann schließlich zu verschwinden. In den inneren Organen seiner Versuchstiere vermochte Appelmans die Lysine nicht nachzuweisen; er betrachtet daher die Intestinalschleimhaut als eine Barrière, welche diese adialysablen und hochkolloïden Stoffe (d'Hérelle, Maisin, eigene Experimente) im unveränderten Zustande nicht überschreiten können. Ist somit der Übertritt der Lysine aus dem Darmlumen in die Zirkulation und in die Gewebe unmöglich, so

scheint — nach den Mitteilungen von d'Hérelle und von Appelmans zu schließen — eine Passage in umgekehrter Richtung leicht stattzufinden. Injiziert man die Lösung eines übertragbaren Lysins subkutan, so zeigt sich das letztere nach kurzem Intervall im Harn und im Darminhalt (in den Faeces), eine Beobachtung, die von Appelmans in dem Sinne gedeutet wird, daß sich der Körper auf diesen Wegen des fremdartigen Stoffes zu entledigen sucht. Es sei in parenthesi bemerkt, daß der Lysingehalt des Darminhaltes nach parenteraler Lysinzufuhr durchaus nicht so zustande kommen muß, daß das Lysin aus den Gefäßen der Mucosa intestinalis austritt; die lytische Substanz könnte ebensogut zunächst aus dem Blute in die Galle und erst sekundär mit der Galle in den Verdauungstrakt gelangen. Einzelne Versuche von Kabeshima lassen sich hiefür verwerten; dieser Autor spritzte in die Ohrvene von Kaninchen 1 ccm einer »gelösten« Kultur von Shiga-Kruse-Bazillen (eines übertragbaren Lysins für toxische Dysenteriebakterien) und konstatierte 30 Minuten bis 16 Stunden später die Anwesenheit des spezifisch lytischen Prinzips in der Galle.

Aus dem Unterhautzellgewebe finden die übertragbaren Lysine relativ schnell den Weg ins Blut (d'Hérelle, Appelmans, Bordet und Ciuca, Otto und Munter u.a.m.); was umso weniger befremden kann, als diese Tatsache mit der Resorptionsfähigkeit anderer kolloïdaler, adialysabler Stoffe von der Subkutis aus in Übereinstimmung steht; es sei nur an das so genau studierte Verhalten der artfremden Serumproteïne erinnert. Das weitere Schicksal der ins Blut aufgenommenen Lysine gestaltet sich, wie man im voraus erwarten darf, ganz ähnlich wie in jenen Fällen, in welchen man den Umweg über die Subkutis vermeidet und die in Rede stehenden Stoffe direkt in ein Gefäß, etwa in eine Vene des großen Kreislaufes einspritzt. Bordet und Ciuca wiesen ein spezifisches Colilysin, welches sie in die Ohrvene von Kaninchen injiziert hatten, nach 24, ja noch nach 48 Stunden im Aderlaßblute nach. Appelmans, der die Verhältnisse bei subkutan injizierten Meerschweinchen untersuchte, kommt zum Schluß, daß die Dauer das Verweilens in der Blutbahn je nach der einverleibten Dosis etwas schwankt, daß aber nach Ablauf von fünf Tagen sowohl das Blut als die inneren Organe ausnahmslos völlig lysinfrei sind; nur in der Milz lassen sich selbst nach diesem Intervall noch recht bedeutende Lysinmengen feststellen, die erst nach der Neutralisation durch die sich bildenden Antilysine, also zum Termin der Antikörperproduktion verschwinden.

Von diesen Ergebnissen bot die sukzessive Reduktion der im Blute kreisenden Lysine ein spezielles Interesse, weil sie unter Umständen Rückschlüsse auf die Natur dieser Substanzen gestatten könnte. Vorher mußte jedoch der Vorgang eingehender analysiert werden; um die Abnahme der zirkulierenden Lysine als Funktion der Zeit darzurtellen, war vor allem die Heranziehung quantitativer Methoden notwendig, in zweiter Linie aber auch die Vermeidung von Fehlerquellen, welche bei den früheren Versuchen nicht berücksichtigt worden waren.

Als Versuchstiere wurden zwei Warmblüterspezies (Kaninchen und Meerschweinchen) und ein Kaltblüter (Rana esculenta) gewählt. Es geschah dies einmal aus dem Grunde, um den erzielten Resultaten von vorneherein einen möglichst großen Geltungsbereich zu sichern, dann aber auch, weil gerade für diese drei Tierarten exakte messende Bestimmungen bekannt sind, welche über die allmähliche Mengenabnahme intravenös injizierter Ultramikroben zahlenmäßige Aufschlüsse geben. Doerr und R. Pick veröffentlichten 1915 eine Arbeit, aus welcher hervorgeht, daß Hühnerpestvirus in Form von erythrozytenfreiem Serum kranker Hühner intravenös injiziert, aus der Blutbahn und aus den Organen natürlich immuner Tiere (Kaninchen, Meerschweinchen, Frösche) innerhalb eines Zeitraumes von 1—2 Stunden vollkommen verschwindet; in empfänglichen Arten kommt es dagegen zu einer Vermehrung wie im Huhn oder in der Gans, oder das Virus hält sich wie in den Tauben je nach der individuellen Beschaffenheit der verwendeten Tiere verschieden lang (1—3 Tage). Nach der Theorie, welche d'Hérelle aufgestellt hat, sollen aber die übertragbaren Lysine ebenfalls aus lebenden Ultramikroben bestehen, die jedoch nicht für höhere Tiere, sondern nur für Protophyten, und zwar für gewisse Bakterienarten pathogen sind. D'Hérelle stellt sich vor, daß die hypothetischen Ultramikroben („Bakteriophagum intestinale") in die Bakterienzellen einwandern und sich nur im Protoplasma der letzteren wie obligate Zellparasiten vermehren; außerhalb der Bakterien könnten die Bakteriophagen — so meint d'Hérelle — zwar lebend und invasionsfähig bleiben, doch seien Wachstums- und Teilungs-Vorgänge völlig ausgeschlossen. Im Sinne dieser Lehre hätten Kaninchen, Meerschweinchen und Frösche als Organismen zu gelten, welche gegen die bakteriophagen Ultramikroben natürlich immun sind; unter der Voraussetzung, daß das Blut dieser drei Tierspezies während des Beobachtungsintervalles von Bakterien frei gehalten wird, welche den Bakteriophagen als Wirte dienen könnten, mußte man daher erwarten, daß sich die Abnahme der intravenös injizierten bakteriophagen Keime im Blute nach ähnlichen Gesetzen vollzieht wie jene des erythrozytenfreien Hühnerpestvirus. Sind dagegen die wirksamen Stoffe, deren Aktion im Twort-d'Hérelleschen Phänomen manifest wird, keine belebten Gebilde, sondern adialysable, hochmolekulare und kolloidal gelöste, unbelebte Substanzen, dann darf man mit hoher Wahrscheinlichkeit voraussagen, daß ihre Elimination aus der Zirkulation ebenso verlaufen wird wie bei anderen Stoffen dieser Art, z. B. bei artfremden Proteïnen oder heterologen Antikörpern; die graphische Darstellung des Prozesses würde nicht einen rapiden Absturz zur Abszisse veranschaulichen, sondern eine jener hyperbolischen Kurven ergeben, wie sie aus den Untersuchungen von Madsen und Walbum, Henderson-Smith, Doerr und R. Pick geläufig sind und bei welchen der horizontale Ast so schwach gegen die Abszissenachse konvergiert, daß der Schnittpunkt beider Linien ziemlich weit vom Koordinatenursprung entfernt ist.

Wie bereits erwähnt, dürften zur Injektion nur Flüssigkeiten ver-

wendet werden, welche neben den übertragbaren Lysinen keine lebenden, gegen das Lysin empfindliche Bakterien enthielten. Die Notwendigkeit dieser Forderung ergab sich nicht nur aus der angestrebten Beweisführung. Daß sich das Lysin in Gegenwart lebender und lösbarer Bakterien vermehren kann, ist eine von allen Beobachtern bestätigte, von der Richtigkeit der d'Hérelleschen Theorie unabhängige Tatsache. Will man also die sukzessive Reduktion der Lysine in der Zirkulation messend verfolgen, so hat man selbstverständlich dafür zu sorgen, daß nicht ein dritter Faktor interveniert, der eine Veränderung mit entgegengesetztem Vorzeichen auszulösen imstande ist. Demgemäß wurde wie folgt verfahren: In ein Röhrchen mit Nährbouillon ($P_H = 7{,}65$) impften wir eine Normalöse (0,002 g) eines Colilysins und unmittelbar darauf eine Normalöse einer 14—16stündigen Kultur eines gegen dieses Lysin hochempfindlichen Colistammes (in der gleichen Bouillon). Das Röhrchen wurde hierauf 12 Stunden bei 37° C gehalten; es war nach dieser Zeit stets makroskopisch ganz klar, wurde aber der Sicherheit halber für eine Stunde in ein Wasserbad von 57° C eingestellt, um alle lebenden Colikeime abzutöten. Der Inhalt dergestalt behandelter Röhrchen diente zur Injektion; er sei kurz als „Colilysin" bezeichnet, da es vorderhand zweckmäßig erscheint, den präjudizierenden Ausdruck „Colibakteriophage" zu vermeiden.

Das auf diese Weise gewonnene Colilysin war nicht ganz ungiftig, vermutlich infolge seines Gehaltes an Bakterienleibern und Bakterienzerfallsprodukten. Ein kräftiges Kaninchen von 3000 g Körpergewicht zeigte bald nach der Injektion von 9 ccm einer Probe von Colilysin deutliche Krankheitssymptome und verendete 3 Stunden nach dem Eingriff. Geringere Dosen (5 ccm) wurden zwar vertragen, aber nicht reaktionslos. Die Kaninchen überlebten, saßen jedoch stundenlang apathisch da, nahmen keine Nahrung auf und hatten erhöhte Temperaturen. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Erfahrungen, die von mehreren Autoren (Bruynoghe und Maisin, Gratia und Jaumain u. a. m.) an Menschen gemacht wurden, denen man analoge, aber mit anderen Bakterien (Typhusbazillen, Staphylokokken) hergestellte Lysine subkutan eingespritzt hatte. Bei den Kaninchen äußerte sich der pathologische Zustand noch in einer anderen Richtung, nämlich in der Leichtigkeit, mit welcher entzündungserregende Reize ausgebreitete, starke, nur sehr langsam zur Resorption gelangende Oedeme hervorriefen. Wenn man z. B. bei einem Kaninchen, welches vorher Colilysin intravenös erhalten hatte, den Ohr-Löffel ohne jede Gewaltanwendung mit einem in Xylol getränkten Wattetupfer abrieb, um die Venen stärker mit Blut zu füllen, so verdickte sich der Löffel in kurzer Zeit bis auf 1 cm und darüber; die Schwellung war durch ein teigiges Oedem bedingt, wie man aus dem Stehenbleiben eines Fingereindruckes schließen konnte, und besaß entzündlichen Charakter, was schon aus der im Verhältnis zur Gegenseite sehr beträchtlichen und anhaltenden lokalen Temperatursteigerung zu entnehmen war. Es soll auf dieses für das vorliegende Thema weniger wichtige, aber an sich interessante Detail nicht näher eingegangen werden; das-

selbe wird den Gegenstand einer späteren Mitteilung bilden. Doch darf vielleicht schon an dieser Stelle auf die Beziehungen verwiesen werden, welches das durch intravenöse Injektion solcher Lysine begünstigte Xyloloedem zu den schweren Xylolschäden besitzt, die sich einstellen, wenn man das reizende Präparat auf die Ohrhaut von Kaninchen einwirken läßt, die man mit einem Eiweißantigen sensibilisiert und kurz vor der Xylolapplikation intravenös reinjiziert hat. (Auer). Im Bilde solcher „anaphylaktischer" Xylolschäden dominieren, wenigstens soweit die akuten, primären Veränderungen ins Auge gefaßt werden, gleichfalls hochgradige, langdauernde Oedeme; der Zusammenhang ist aber zweifellos nicht nur ein äußerlicher, symptomatologischer, sondern im Wesen der beiden Phänomene begründet, da es ja längst bekannt ist, daß die verschiedensten Tierarten auf eine intravenöse **Erstinjektion** von Bakterien, Bakterienextrakten oder Bakterienautolysaten ganz ähnlich reagieren wie spezifisch vorbehandelte Individuen derselben Spezies auf die intravenöse **Reinjektion** der an sich d. h. für normale Tiere blanden Eiweißantigene (z. B. der artfremden Serumproteïne).

Für die Titration des Lysingehaltes stehen derzeit zwei Methoden zur Verfügung, die sich voneinander versuchstechnisch, wahrscheinlich aber auch prinzipiell unterscheiden. Ein Verfahren wurde zuerst von Twort angegeben und in der Folge von d'Hérelle, Bail, Watanabe für quantitative Zwecke ausgebildet; dasselbe besteht darin, daß man die zu untersuchende Flüssigkeit fortschreitend verdünnt, zu den Verdünnungen die beeinflußbare Bakterienkultur zusetzt und die Gemische auf einer Agarfläche ausbreitet. In dem bei der nachfolgenden Bebrütung wachsenden Bakterienrasen erscheinen ausgesparte Stellen („tâches vièrges"), deren Zahl in einem geraden Verhältnis zum Lysingehalt der betreffenden Verdünnung steht; die Grenzdiluition, die nur mehr ein Loch im Bakterienrasen liefert, gestattet einen Schluß auf die Lysinkonzentration des zu untersuchenden Ausgangsmateriales und kann als „Lysintiter" gelten. Für die in dieser Arbeit benützten Versuchsanordnungen schien jedoch die Zählung der „tâches vièrges", welche d'Hérelle und seine Anhänger als Bakteriophagenkolonien ansehen, weit weniger geeignet als die Methode von Appelmans, welche den „Lysintiter" durch die Feststellung jener Grenzverdünnung mit Bouillon bestimmt, in welcher eingesäte empfindliche Bakterien noch der Lyse anheimfallen. Diese Technik liefert, richtig angewendet, sehr zuverlässige Resultate, wie u. a. daraus erhellt, daß man bei wiederholten Titrationen einer Lysinprobe immer den gleichen Wert bekommt, selbst wenn man, was bei über längere Zeit ausgedehnten Serienmessungen nicht zu umgehen ist, die Beimpfung der Lysinverdünnnungen mit von Reihe zu Reihe wechselnden Kulturen des empfindlichen Stammes vornimmt. Die Titration der übertragbaren Lysine nach Appelmans ist speziell in jenen Fällen indiziert, wo wie bei den hier mitgeteilten Experimenten keine der zu messenden Flüssigkeiten neben dem lytischen Agens noch überlebende Bakterien enthielt; solche Keime, welche die Beeinflussung durch ein übertrag-

bares Lysin überstehen, erweisen sich später einerseits als resistent, sodaß sie sich auch im lysinhaltigen Medium vermehren, andererseits werden sie selbst zu Lysinproduzenten („lysinogene" Colistämme), zwei Eigenschaften, welche notwendigerweise die ungestörte Auswertung des Lysingehaltes in den Bouillonverdünnungen beeinträchtigen und die ablesbaren Endresultate verschleiern müssen.

Wie im einzelnen vorgegangen wurde, soll nun kurz beschrieben werden, wobei die Auswertung der den Versuchstieren intravenös injizierten Colilysine als Paradigma dienen kann.

Es sei daran erinnert, daß man diese Colilysine erhält, wenn man ein Bouillonröhrchen mit einer Normalöse einer lysinhaltigen Bouillon und einer Normalöse einer 14—16stündigen Bouillonkultur des zugehörigen sensiblen Colistammes beimpft, 12^h bei 37^0 C hält und die makroskopisch klar gebliebene Bouillon durch einstündiges Erwärmen auf 57^0 C sterilisiert.

Titration der Colilysine.

Von dem Lysin werden Verdünnnngen mit steriler Bouillon ($P_H = 7{,}65$) angefertigt derart, daß man zu den 9 ccm Bouillon, welche jede Eprouvette enthält, mit steriler Pipette einen Kubikzentimeter aus dem vorhergehenden Röhrchen zusetzt, gut durchmischt, dann einen Kubikzentimeter in das nächste Röhrchen der Reihe überträgt u. s. f. für das Anlegen jeder einzelnen Verdünnung ist stets eine neue Pipette zu verwenden; beim Außerachtlassen dieser Vorschrift ändern sich die erhaltenen Werte aus begreiflichen Gründen und werden überdies inkonstant. Wie weit man mit den Verdünnungen gehen soll, ergibt die Erfahrung; eine zu lange Reihe ist aber schließlich kein störender Fehler, während eine zu kurze, da sie keine Aussage über den Grenztiter ermöglicht, eine sehr unangenehme Lücke im Gesamtversuch bedeuten kann. Sämtliche Bouillonverdünnungen und ein gleichfalls 9 ccm Bouillon enthaltendes Kontrollröhrchen werden nun mit je einer Normalöse einer 12—14stündigen Bouillonkultur des sensiblen Colistammes beimpft. Auf die gleichmäßige Beschaffenheit dieser Bouillonkulturen ist großes Gewicht zu legen; die Untersuchungen von Penfold, Graham-Smith u. a. orientieren darüber, wie man dieses Ziel durch Wahl desselben Nährbodens, stets gleiche H-Jonenkonzentration, gleiches Alter der Kulturen, gleiche Einsaatmengen, Züchtung bei der nämlichen Temperatur etc. erreicht. — Die geimpften Röhrchen bringt man in den Thermostaten und läßt sie darin solange stehen, bis die Kontrolle deutlich durch Bakterienwachstum getrübt ist, und bis sich in der Reihe der Röhrchen mit den Lysinverdünnungen keines mehr nach anfänglicher Trübung aufhellt. Die stärksten Konzentrationen bleiben nämlich während der ganzen Bebrütungsdauer völlig klar; in den schwächeren erfolgt zuerst eine mit freiem Auge wahrnehmbare Bakterienproliferation, dann aber setzt die Lyse ein und macht die getrübte Bouillon wieder homogen und transparent. Das Grenzröhrchen, welches durch seine Transparenz noch deutlich gegen die Kontrolle absticht, gibt den Titer an. Ist man im Zweifel,

so kann man die Grenzröhrchen 1 Stunde auf 57° C erhitzen und vom sterilisierten Inhalt neuerlich geringe Mengen etwa 0,1 ccm auf frische Bouillonröhrchen übertragen, die man dann wieder mit dem sensiblen Coli beimpft. In der Regel bestätigt das Ergebnis dieser „Passagen" die Richtigkeit der ersten Ablesung. Schreibt man die Mengen der Ausgangsflüssigkeit an, welche die einzelnen Röhrchen enthalten, und zwar der Einfachheit halber (mit Vernachlässigung eines kleinen Fehlers) in steigenden negativen Potenzen der Grundzahl 10, so hat das Endergebnis einer solchen Lysintitration nachstehende Form:

1,0 ccm	0	10^{-6} ccm	0
10^{-1} „	0	10^{-7} „	0
10^{-2} „	0	10^{-8} „	0
10^{-3} „	0	10^{-9} „	++
10^{-4} „	0	10^{-10} „	++
10^{-5} „	0	Kontrolle:	++

wobei die Null kein Wachstum, somit „Anwesenheit" oder vielleicht richtiger „ausgeübte Wirkung" des lytischen Prinzips. das Zeichen ++ gleiches Wachstum wie in der sicher lysinfreien Kontrolle d. h. Ausbleiben dieser Wirkung bedeutet. Das Grenzröhrchen enthält im vorliegenden Fall 10^{-8} ccm (genau $0{,}9 \cdot 10^{-8}$ ccm) des Ausgangsmateriales, also des zu titrierenden Colilysins; diese benannte Ziffer repräsentiert den Titer, das Maß für die Konzentration der verwendeten Lysinprobe. Wie man sich nun geeinigt hat, die H-Jonenkonzentrationen nicht in Form der Wasserstoffzahlen, sondern in Form ihrer Logarithmen auszudrücken und bei diesen „Wasserstoffexponenten" das selbstverständliche Minuszeichen fortzulassen, so kann man auch hier die Zahl 8 als „Lysinexponenten" betrachten und sich dadurch die tabellarische sowohl als die graphische Wiedergabe der Auswertungen sehr erleichtern. Für den Lysinexponenten sei die Abbreviatur e_L vorgeschlagen. Damit würde sich die obige Reihe auf die Form $e_L = 8$ bringen lassen, die an Präzision und Kürze wohl nichts mehr zu wünschen übrig läßt.

Nach diesen Erläuterungen versteht sich der restliche Teil der Versuchsanordnungen von selbst. Bei den intravenös injizierten Tieren wurden nach verschiedenen Intervallen Blutproben entnommen und gemessene Mengen des frischen, ungeronnenen Blutes (bei Kaninchen oder Meerschweinchen 1,0 ccm, bei Fröschen 0,1 ccm) in 9 ccm sterile Bouillon eingetragen. Die Blut-Bouillon-Mischungen wurden sodann in der angegebenen Weise mit Bouillon fortschreitend verdünnt. die Verdünnungen mit Coli beimpft und bei 37° C gehalten. Die ermittelten Grenzwerte gaben die Lysinexponenten der untersuchten Blutproben an, wobei auf die Zusammensetzung des Blutes aus Plasma und Zellen keine Rücksicht genommen wurde; der Vergleichswert der gefundenen Lysinexponenten konnte dadurch keinesfalls wesentlich beeinträchtigt werden. Daß das Blut der verwendeten Versuchstiere in den in Betracht kommenden Konzentrationen weder die Entwickelung der Colibakterien noch auch den Ablauf des Twort-d'Hérelleschen Phänomens hemmt, hatten besondere ad hoc angestellte Versuche gezeigt.

Versuche an Kaninchen.

Einem Kaninchen von 3000 g Körpergewicht werden 3 ccm eines Colilysins ($e_L = 9$) intravenös (in die linke Ohrvene) injiziert. Nach 10 Minuten, nach 1, $2^1/_2$, 6, $18^1/_2$, 24 und 48^h, ferner nach 4×24 Stunden wird je 1 ccm Blut aus der rechten Ohrvene mit steriler Spritze aspiriert; bei allen Blutproben wird der Lysinexponent bestimmt. Es wurden folgende Werte ermittelt:

Abgelaufene Zeit:	Lysinexponent:
10 Minuten	5
1 Stunde	4
$2^1/_2$ Stunden	3
6 „	3
$18^1/_2$ „	2
24 „	2
48 „	1
4 Tage	1

Der erste Wert ($e_L = 5$) ist entschieden etwas kleiner, als man erwarten würde, wenn er lediglich auf die Verdünnung des injizierten Lysins durch das Gesamtblut zu beziehen wäre. Veranschlagt man die Blutmenge eines Kaninchens von 3 kg Körpergewicht mit 200 ccm, die Menge des Blutplasmas mit 100 ccm, so müßte der Lysinexponent von 9 auf 7 zurückgehen; das Grenzröhrchen der Auswertungsreihe sollte also erst jenes sein, welches $0.9 \cdot 10^{-7}$ ccm Blut $= 0{,}45 \cdot 10^{-7}$ ccm Plasma enthält, da diesem Quantum Blut oder Plasma noch immer $3 \cdot 10^{-9}$ Colilysin, also das Dreifache des wirksamen Minimums entsprechen würden. Statt dessen wirkte nur mehr $0{,}9 \cdot 10^{-5}$ ccm Blut; es mußte somit in dem Zeitraum von zehn Minuten, der zwischen Lysininjektion und erster Probeentnahme verstrich, bereits eine sehr erhebliche Reduktion des Lysins stattgefunden haben, sei es nun durch Bindung an die Organparenchyme oder durch Aufnahme (Adsorption, Phagozytose) seitens der roten und weißen Blutzellen oder endlich durch die Ausscheidung, welche nach den Angaben der Literatur durch die Leber, die Niere, möglicherweise auch durch den Darm erfolgt.

Am 4. Tage wirkte das Blut des Kaninchens noch in der Menge von 0,1 ccm (in 9 ccm Bouillon) lytisch. Hier wurden die Auswertungen abgebrochen. Mehrere andere, an Kaninchen verschiedenen Gewichtes ausgeführte und analog angeordnete Experimente ließen aber erkennen, daß der 4. Tag konform den Daten von Appelmans tatsächlich an den äußersten Termin, bis zu welchem sich nachweisbare Lysinspuren im Blute finden, hart angrenzt. Als Illustration mag noch das nachstehende Beispiel an dieser Stelle Platz finden.

Kaninchen A_7, 3000 g schwer, bekommt in die linke Ohrvene 5 ccm eines Colilysins vom Lysinexponenten 8 (kleinste, eben noch in 9 ccm Bouillon lytisch wirkende Menge $3 \cdot 10^{-8}$ ccm). Blutentnahmen aus der rechten Ohrvene durch Aspiration mit steriler Spritze nach 12 Minuten, 1, $4^1/_2$, $7^1/_2$, 22 und 48 Stunden. Ferner nach 3 und nach 5 Tagen.

Auswertungen des Lysingehaltes.

Abgelaufene Zeit:	Lysinexponent:
12 Minuten	4
1 Stunde	3
$4^1/_2$ Stunden	3
$7^1/_2$ „	3
22 „	2
2×24 „	1
3×24 „	0[1])
5×24 „	Kein Lysin nachweisbar

Bei allen Auswertungsreihen vollzog sich der Schwund des Colilysins aus dem Blute im Beginne der Beobachtungszeit in ungleich rascherem Tempo als in der Folge. Bei dem erstangeführten Kaninchen z. B. betrug die Lysinreduktion in den ersten $2^1/_2$ Stunden das Hundertfache bzw. den hundertsten Teil des ersten nach der Injektion ermittelten Wertes; eine weitere gleich starke Abnahme beanspruchte aber bereits ca. 2 Tage. Das Lysin verhielt sich somit wie irgendein in den Kreislauf eingeführtes Eiweiß oder wie ein heterologer intravenös injizierter Antikörper. Vielfach erhielt man allerdings den Eindruck, als ob die Ausscheidung nicht kontinuierlich in Form einer Hyperbel vor sich geht, sondern treppenförmig, indem sich der Titer geraume Zeit auf gleichem Niveau hielt, um dann unvermittelt abzunehmen. Hamburger und seine Mitarbeiter haben behauptet, daß auch artfremde Proteïne und an ihnen haftende Antitoxine im Blute des Menschen, des Hundes und des Kaninchens ein ähnliches

1) Der Lysinexponent „Null" hat, wie wohl nicht näher auseinandergesetzt zu werden braucht, einen Sinn; er bedeutet, daß die kleinste Menge der zu titrierenden Flüssigkeit, welche noch in 9 ccm Bouillon lytisch wirkt, $1 \cdot 10^0$ ccm beträgt (genau $0{,}9 \cdot 10^0$) d. h. daß die Auswertungsreihe nur in der ersten Eprouvette ein positives Resultat geliefert hat. — Theoretisch wäre auch der Lysinexponent $+1$ möglich; er würde den Fall charakterisieren, daß die zu prüfende Flüssigkeit nur im konzentrierten Zustande das Twort-d'Hérellesche Phänomen gibt, weil dann die kleinste eben noch lytisch wirkende Menge (bei dem durch die Versuchsanordnung im voraus fixierten Reaktionsvolum von 9 ccm) durch $0{,}9 \cdot 10^{+1} = 9$ ccm ausgedrückt werden müßte. Doch spielt der Exponent $+1$ de facto keine Rolle; für Auswertungen von Blutsproben kommt er überhaupt nicht in Betracht. — Es ist natürlich Geschmackssache, ob man den „Lysinexponenten" in der präzisierten Weise definieren oder ob man dem Ausdruck die zweite der beiden möglichen Begriffsbestimmungen unterlegen will. Man könnte nämlich statt der kleinsten lytisch wirkenden Menge auch den Verdünnungsgrad der Ausgangsflüssigkeit als Maßstab wählen. Bezeichnet man den Grad der Diluition bei der konzentrierten (zu prüfenden) Flüssigkeit mit Null, bei den folgenden Röhrchen mit $^1/_{10}$ oder 10^{-1}, $^1/_{100}$ oder 10^{-2} und schreibt man wieder nur die Exponenten ohne Minuszeichen an, so würden sich die Ziffern gegen jene der „kleinsten lytischen Mengen" verschieben, wie das die Übereinanderstellung der korrespondierenden Werte beider Bezeichnungsweisen lehrt.

Lysinexponenten als	Verdünnungsgrade;	0	1	2	3	4	5
	kleinste lytische Mengen:	$+1$	0	-1	-2	-3	-4

Man vermag einzusehen, daß die in der oberen Reihe angewendete Schreibweise unter Umständen gewisse rechnerische Vorteile bieten kann.

Verhalten zeigen und nicht stetig sondern ruckweise (sakkadiert) abnehmen. Abgesehen davon, daß diese Angaben kontrovers sind, muß für die vorliegenden, die Lysine betreffenden Daten berücksichtigt werden, daß zwischen den durch die angewendete Titrationsmethode ermittelbaren Werte große Intervalle bestanden, sodaß die Interpolation von Zwischenverdünnungen vielleicht ein anderes Bild geliefert haben würde.

Versuche an Meerschweinchen.

Eine Anzahl von Meerschweinchen wurde mit 0,5 ccm eines sterilen Colilysins ($e_L = 8$) intravenös injiziert. Injektion in die linke Jugularvene. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Tiere aufgespannt und Blut (1 ccm) durch Herzpunktion und Aspiration mit steriler Glasspritze gewonnen. Die Ermittelung des Lysintiters (Lysinexponenten) im Blute erfolgte nach der bereits beschriebenen Methode.

Das Körpergewicht der Meerschweinchen belief sich auf 500—600 g, die Menge des Blutes schätzungsweise auf 40, jene des Blutplasmas auf 20 ccm. Reine Diluition durch das strömende Blut hätte somit den Titer um das Zwanzigfache, den Lysinexponenten um 1, höchstens um 2 vermindern können; aber selbst eine nach 6 Minuten ausgeführte Herzpunktion ergab für den Lysinexponenten nur noch den Wert 5.

a) Herzpunktion bei Tier A, ausgeführt 6 Minuten nach der Injektion des Colilysins in die Drosselvene.
Lysinexponent = 5.
b) Tier B, Punktion nach 1 Stunde.
Lysinexponent = 3.
c) Tier C, Punktion nach 4 Stunden.
Lysinexponent = 3.
d) Tier D, Punktion nach $7^1/_2$ Stunden.
Lysinexponent = 3.
e) Tier E, Punktion nach $1^1/_2$ Tagen.
Lysinexponent = 2.
f) Tier F, Punktion nach 2 Tagen.
Lysinexponent = 0.
g) Tier G, Punktion nach 3 Tagen.
Lysinexponent = 1.
h) Tier H., Punktion nach 3 Tagen.
Kein Lysin nachweisbar.
i) Tier I, Punktion nach 3 Tagen.
Lysinexponent = 0.
k) Tier K, Punktion nach 3 Tagen.
Lysinexponent = 1.

Beim Meerschweinchen hielt sich das Colilysin im Blute ungefähr ebensolange wie beim Kaninchen, wobei allerdings nicht unbedeutende individuelle (von der injizierten Dosis unabhängige) Schwankungen zu beobachten waren. (Vgl. die Ergebnisse bei den Meerschweinchen F, G, H, I und K).

Es wurde dann noch der Versuch angestellt, ob man bei Tieren, in deren Blut nur mehr ganz geringe Lysinspuren nachzuweisen sind, nicht etwa durch nachträgliche intravenöse Zufuhr der empfindlichen Bakterien einen erneuten Anstieg des Lysins provozieren kann. Von den beiden Meerschweinchen H und I hatte H 3 Tage nach der Einspritzung von Colilysin keine mit der angewendeten Methodik nachweisbaren Lysinreste; doch war anzunehmen, daß das benützte Verfahren, bei welchem nur 1 ccm Blut = 0,5 ccm Plasma als größte Menge untersucht werden kann, versagt, wenn die Konzentration des Lysins zwar noch nicht Null geworden, aber doch eine bestimmte untere Grenze unterschreitet. Bei I wirkte 1 ccm Herzblut noch deutlich lytisch.

Knapp nach den Herzpunktionen wurde nun sowohl bei H als bei I die rechte Jugularvene aufpräpariert und in das Gefäß 0,25 ccm einer 12 stündigen Bouillonkultur des empfindlichen Colistammes eingespritzt. Sodann wurden bei jedem Tiere zwei weitere Herzpunktionen ausgeführt, und zwar die eine 6 Stunden, die zweite 17 Stunden nach der Zufuhr der lebenden Coli-Keime. Die Auswertungen der durch die Punktionen gewonnenen Blutproben ergab nicht nur keine Vermehrung, sodern vielmehr völliges Fehlen der spezifischen Lysine.

Dieses Resultat ist für die Auffassung der übertragbaren Lyse und für die Ansichten über die Natur und Provenienz der dabei beteiligten wirksamen Stoffe nicht ohne Bedeutung. Wie Bordet und Ciuca vermuteten und wie Doerr und Grüninger nachzuweisen versuchten, scheint eine Mengen-(Konzentrations-)Zunahme der Lysine nur nach vorausgegangener oder bei gleichzeitig stattfindender Bakterienvermehrung möglich zu sein. Es ist nun bekannt, daß sich Colibakterien in der Zirkulation von Kaninchen oder Meerschweinchen nicht vermehren, sondern solange kreisen, bis sie entweder zerfallen oder phagozytiert oder ausgeschieden oder in gewissen Organen zurückgehalten werden. Dementsprechend bleibt auch der Lysinanstieg aus; der Bakterienzerfall, aus welchem einige Autoren das Lysin hervorgehen lassen wollen, hatte, obwohl die eingeführte Bakterienmenge beträchtlich war, keinen lysinogenen Effekt.

Versuche an Fröschen.

Eine Anzahl Frösche erhielten intravenös (in die mittlere Vene der Bauchwand) 1,0 ccm Colilysin vom Titer (Lysinexponent) 8. — Größere Lysindosen (2,0 ccm) töteten die Frösche innerhalb einiger Stunden. — Nach verschiedenen Zeitintervallen wurde je ein Frosch aufgespannt, das Herz freigelegt und aus demselben genau 0,1 ccm Blut entnommen. Diese Menge kam in das erste Röhrchen der betreffenden Auswertungsreihe, sodaß dasselbe dem Lysinexponenten 1 entsprach.

a) Frosch A, Herzpunktion nach 24 Stunden.
Lysinexponent des Herzblutes = 4.

b) Frosch B, Herzpunktion nach 2 Tagen.
Lysinexponent = 4.

c) Frosch C, Herzpunktion nach 4 Tagen. Lysinexponent = 2.
d) Frosch D, Herzpunktion nach 5 Tagen. Lysinexponent = 2.
e) Frosch E, Herzpunktion nach 7 Tagen. Lysinexponent = 1.

Auch beim Kaltblüter konstatiert man also die allmähliche Abnahme und eine lange Persistenz, die sich über einen Zeitraum von mehr als 7 Tagen erstreckt.

Zusammenfassung.

1. Intravenös injizierte, bakterienfreie übertragbare Lysine („Bakteriophagen") zeigen weder bei Warmblütern (Meerschweinchen, Kaninchen) noch bei Fröschen das für Ultramikroben (Hühnerpestvirus) charakteristische Verhalten. Sie verschwinden aus der Zirkulation nicht rasch (kritisch), sondern nach den für kolloidal gelöste Eiweißkörper (artfremde Proteïne, heterologe Antikörper) ermittelten Gesetzen.

2. In der Blutbahn der Kaninchen finden sich die injizierten Lysine bis zum 5. Tag, beim Meerschweinchen ebensolang, bei Fröschen länger (mehr als 7 Tage).

3. Eine Lysinvermehrung im Blute kann durch intravenöse Injektion der lebenden lösbaren Bakterien nicht hervorgerufen werden, sofern letztere sich nicht im Blute vermehren. Es spricht dies gegen die Enstehung der Lysine aus zerfallenden Bakterien und weist darauf hin, daß die Produktion dieser Stoffe mit dem Wachstum und der Vermehrung der Bakterien enge verknüpft ist (Bordet und Ciuca, Doerr und Grüninger).

4. Um die Lysintitrationen nach Appelmans und ihre Verwertung zu vereinfachen, wird der Begriff des Lysinexponenten in die quantitative Methodik eingeführt.

Literatur.

Appelmans: C. r. Soc. Biol. Bd. 85, Nr. 36, 1922; ebenda Bd. 85, S. 722, 1921; ebenda Bd. 86, Heft 9, 1922.

Appelmans und Wagemans: C. r. Soc. Biol. Bd. 86, Heft 13, 1922.

Bail O.: W. kl. W. 1921, Nr. 20, 37, 46.

Bordet und Ciuca: C. r. Soc. Biol. Bd. 83, 1920, S. 1293, ebenda S. 1296; ebenda Bd. 84, S. 276, 1921; ebenda S. 278, 280, 745, 747, 748; ebenda Bd. 85, 1921, H. 36; ebenda Bd. 86, 1922, H. 5.

Gratia A.: C. r. Soc. Biol. 1921, Bd. 85, S. 275, 25; ebenda Bd. 84, S. 750, 751, 753, 755.

D'Hérelle: Presse medical Jg. 29, 1921, Nr. 47, S. 463; C. r. de l'Acad. de Science 1917, Bd. 165, S. 373; ebenda 1918 Bd. 167, S. 970; ebenda 1919 Bd. 168, S. 631; Bd. 169, S. 932; ebenda 1920 Bd. 170, S. 72; ebenda 1921 Bd. 172, S. 99; C. r. Soc. Biol. 1918 Bd. 81, S. 1160; ebenda 1919 Bd. 82, S. 1237; ebenda 1920 Bd. 83, S. 52, 97, 247, 1318, 1320; ebenda 1921 Bd. 84, S. 339, 384, 538, 863, 908, Bd. 85, S. 701, 767; ebenda 1922 Bd. 86 Heft 7, 9, 12.

D'Hérelle und Eliava: C. r. Soc. Biol. 1921, Bd. 84, S. 719.

Otto und Munter: D. m. W. Jahrg. 17 1921 Nr. 52.

Otto und Winkler: D. m. W. 1922, Nr. 12.

Auch an dieser Stelle möchte ich meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Doerr, für die freundliche Hilfe bei meiner Arbeit meinen verbindlichsten Dank aussprechen.